

Методы электронной микроскопии биологических и абиогенных структур в искусственных газовых атмосферах

О. В. Градов^{a, b}, М. А. Градова^b

^aИнститут энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН,
Ленинский проспект, 38, г. Москва, 119334, Россия

^bИнститут химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, Россия, e-mail: o.v.gradov@gmail.com

В данном обзоре рассматриваются возможности использования электронной микроскопии в газовых средах для анализа и морфофизиологического воздействия на биологические структуры. Исследуются подходы, в рамках которых изменяется не только состав газовой атмосферы, но и температура, влажность, давление/разрежение. Указывается на применимость кинетического/динамического подхода для манипуляций на тканях и биокосных структурах. Как частный случай воздействия на среду в искусственных атмосферах отмечается возможность моделирования индуцируемого пучком формирования и дезинтеграции молекулярных структур абиогенетического характера.

Ключевые слова: электронная микроскопия, микроскопия в газовых средах, электронная обработка, искусственные атмосферы, газовые микрокамеры, абиогенез.

УДК 537.533.35 + 612.086.3 + 621.78.062.57 + 621.78.062.3

1. ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ГАЗОВОЙ СРЕДЕ

Для экспериментально-морфологических исследований *in situ* под электронным пучком, воздействующим на единичные клетки [1] и ткани [2], наивысшую проблему и сугубую необходимость в последней четверти XX века представляло создание в камере, пригодной для прижизненного наблюдения и сохранения физиологических функций, изучаемого объекта газовой среды, что входило в противоречие с достижимостью качества детектирования изображения или аналитического сигнала от экспериментальной ткани из-за неизбежности рассеяния электронов в газе [3], из чего следовало не только взаимодействие облучающего пучка со средой, окружающей биологический объект, но и взаимодействие сигнального, то есть детектируемого пучка с газом [4], делавшее бессмысленным всякие попытки получения аналитической информации из зарегистрированного сигнала в силу эффектов электронно-ионной рекомбинации [5] и фоновых проблем с катодолюминесценцией и сцинтилляциями в газе [6]. Из данных предпосылок насущным требованием практики являлось преодоление противоречия между прижизненным характером физиологического исследования объекта в естественной природной среде, которую следовало иметь для этого в электронно-микроскопической камере (состав газа, варьируемые температура и давление, возможность частичного замещения состава газа в целях прекондиционирования [7–9], в том числе при изменении давления в камере и парциального давления газа [10, 11] и т.д.), и потребностями регистрации, являвшимися неотъемлемыми, по физическим причинам (или, вернее, принципам), свойствами самого метода.

Более того, при отсутствии возможностей микроскопии в различных газовых средах отсутствовала и возможность прижизненного динамического изучения структуры клеток и тканей в зависимости от изменения состава экспериментальной «атмосферы» (легшей в основу такой перспективной на данный момент отрасли, как газовая биология [12, 13]), несмотря на то что методы динамического, в частности, прижизненного исследования структур известны были в электронной микроскопии с середины 1960-х годов (т.н. «стробоскопическая электронная микроскопия» [14–17], в настоящее время успешно замещенная методами четырехмерного электронно-микроскопического анализа [18–20], хотя многие подобные методы микроскопии, в частности, динамическая криоэлектронная микроскопия и микрообработка, являющаяся новым подходом в структурной, системной и синтетической биологии [21], сохраняют элементы классической стробоскопической техники [22]).

Решение было достигнуто в пионерских работах Г.Д. Данилатоса, заложившего принципы нового метода – т.н. ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy), позволившего вводить образцы в контролируемую газовую среду, включая атмосферную. Опуская промежу-

точные фазы публикационной активности указанного автора, имеющего более полусотни работ по ESEM, для полноты сведений можно сослаться на серию работ, в которых описывалась обобщенная форма аппаратуры такого рода, пригодной как для атмосферной сканирующей микроскопии, так и для аналогичной электронной микроскопии в контролируемой газовой среде [23–26]. Немногим позже аналогичные установки стали достаточно распространены в различных лабораториях, что привело к созданию множества техник тонкого ультраструктурного или цитоморфологического анализа при атмосферном давлении. В настоящее время существует множество методов и техник такого рода, включая сканирующую просвечивающую электронную микроскопию атмосферного давления [27], корреляционную сканирующую электронную микроскопию в атмосферной среде и корреляционную иммуноэлектронную микроскопию в атмосферной среде [28, 29], технологии атмосферной сканирующей электронной микроскопии для регистрации динамических явлений в жидкостях и газах, на соответствующих границах раздела фаз [30]. Эти технологии подходят для анализа одиночных клеток в газовой среде [31, 32], культур клеток и тканей [33, 34], визуализации и систематизации биологически значимых объектов окружающей среды [35] и микрокристаллов белка [36] (в последнее время при нормальном давлении окружающей среды удается достигать эффективной визуализации вплоть до атомарного уровня [37]).

2. БИОФИЗИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ГАЗОВОЙ СРЕДЕ

Можно выделить два принципиальных элемента атмосферной электронной микроскопии и электронной микроскопии в газовой среде для биологических приложений: а) достижение варьируемого давления нагнетаемой «атмосферы»; б) подбор биологически оптимального химического состава «атмосферы». Первые попытки создания электронных микроскопов с контролируемым давлением газа относятся к началу 1960-х гг. [38], но их актуализация произошла только после создания ESEM в 1980-х, а в настоящее время электронные микроскопы варьируемого давления интенсивно используются для зарядово-контрастного картирования биологических образцов [39] и подобных задач биологической визуализации [40], а также для ультрамикроскопической пробоподготовки и обработки образцов на наноструктурном уровне [41]. Вторая проблема несколько сложнее, поскольку, если рассматривать электронную микроскопию в

реакторном приближении [42], необходимо принять во внимание неизбежное взаимодействие нагнетаемого в камеру газа с газовыми компонентами биологических тканей, что особо актуально в случае таких популярных для электронно-микроскопической визуализации объектов, как газовые вакуоли одноклеточных [43] или ткани легких [44], а также в экспериментах по изучению вторичной структуры белка в газовых везикулах [45] и прикладных тестовых измерениях на газопроницаемых линзах [46]. Так как многочисленные миогистологические исследования и смежные молекулярно-биологические работы также проводятся в электронно-микроскопических камерах с контролируемым составом газа [47, 48], это утверждение можно распространить и на эту область, а учитывая каталитический характер взаимодействий и ферментативные свойства миозина [49], и интерпретировать это направление как аналог каталитических электронно-микроскопических исследований в газовой среде [50]. Понятно, что, так как каталитические процессы в биологической среде протекают по принципам биофизической химии [51] и ферментативной кинетики [52], переход к исследованию микроструктуры и ультраструктуры в нативных атмосферных условиях, сохраняющих динамику, равнозначен появлению электронно-микроскопической динамической биохимии – уже не в том, достаточно упрощенном понимании, как это было в 1940–1950-е [53, 54], влиявшем на научную мысль, и в конце 1980-х [55], а в том, более современном смысле, который связан с химическим и макромолекулярным (даже фазово-супрамолекулярным) анализами [56], компартментализацией и химической, в частности современной энзиматической кинетикой [57].

Динамические физико-химические процессы могут быть исследованы при термостатировании экспериментальной среды на заданном уровне. Биофизические и физиологические процессы также требуют термостатирования (если речь идет не о криобиологии и не об экстремофилах). Соответственно необходимы электронно-микроскопические аксессуары и средства пробоподготовки и содержания образца *in situ* в камере с термо-/криостатированием.

Для контроля среды в газовой камере в настоящее время разработаны дифференцированные средства: газоинжекционные держатели с термонагревом в просвечивающей микроскопии [58], специализированные ячейки для *in situ* наблюдений [59, 60], многофункциональные сканирующие электронно-микроскопические системы для работы в контролируемой среде [61], прогрессивно отличающиеся от ранних конструкций [62]

(в частности – широкодиапазонным температурным контролем с сохранением содержания газов в аналитической камере [63]). Под данную аппаратуру разработаны множественные метрологические методики, применимые и при работе с биологическими или смешанными объектами. Речь идет о методах полуколичественного рентгеновского микроанализа с цифровой обработкой данных, нивелирующей вносимые газом искажения [64], специальных устраняющих аберрации средовых технологиях [65], техниках измерения эффективного пути пробега носителей заряда сканирующего пучка в газовой среде [66], газво-каскадном усилении в электронной микроскопии высокого разрешения [67], методах контроля состава газа в камере в режиме реального времени при электронной спектроскопии на низких энергиях или химической визуализации, осуществляемой на эквивалентных принципах [68]. Наивысшая точность метрологии достигается в позиционно-чувствительном анализе такого рода при использовании совершенных экспериментальных установок с электронной эмиссией с углеродных трубок, возмущаемых при газовых и атмосферных условиях плазмой атмосферного давления [69].

3. ПРОБЛЕМЫ ВЛАЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ХАРАКТЕРА СРЕДЫ

Во всех биологических работах по электронной микроскопии атмосферного давления имеет место единая проблема – влажность образцов (аналогично тому, как в рентгеноструктурном или рентгенодифракционном анализе качество поверхности зависит от смачиваемости кристалла и может качественно определяться ею [70]). Как очевидно из психрометрических принципов [71], скорость испарения жидкости увеличивается по мере уменьшения давления и относительной влажности воздуха, а значит, требуется использовать поддерживающую некоторую влажность камеру, но это может входить в противоречие с оптимальными для регистрации параметрами газовой колонны и/или камеры. В то же время необходимость психрометрической оптимизации для клеток, тканей или изолированных фрагментов может считаться доказанной (по крайней мере – давно и хорошо изученной для растений [72, 73] и постулируемой из очевидных соображений для климатической стабилизации при культивации животных тканей в инкубаторах контролируемой газовой среды с термостатированием [74–76]).

С начала 1970-х гг. [77, 78] появляются работы по конструкциям средовых камер для анализа

влажных биологических образцов. В последнее время эта тенденция продолжает развиваться, но уже с упором на наноструктурное материаловедение [79]. Последние достижения в области микроструктурной акваметрии связаны с криоэлектронной микроскопией [80], в особенности с корреляционным анализом индуцированных изменений при нуклеолярном стрессе [81]. Акваметрия при наличии атмосферы или искусственного газового заполнения камер отличается от известных термовакuumных методов акваметрии [82], так как с психрометрических позиций обладает большей сложностью и размерностью кривых – в зависимости от содержания газов. Интересной проблемой является корреляция данной характеристики со смачиваемостью поверхности и ее сорбционными характеристиками, так как гидрофобность влияет на формирование конденсата и результат электронно-микроскопического замера точки росы при отсутствии других показателей [83].

Одними из частных случаев таких затруднений являются сорбционные, фильтрационные препараты и хроматографические носители, получаемые в результате биохимических и молекулярно-биологических изысканий. В частности, известны изменения в структуре сорбентов при газовой хроматографии [84, 85] и аналитических пластинок, в основе которых лежат реакции с поверхностью твердого тела [86]. Более того, имеются специализированные электронно-микроскопические установки для получения изотерм адсорбции [87], данных о структурных изменениях на атомном уровне в ходе взаимодействия газа с твердой поверхностью [88] и наблюдения процессов взаимодействия в режиме реального времени [89, 90]. Если учесть, что большинство цитоморфологических и ультраструктурных изысканий вообще производится на подложках и электронно-микроскопических сетках, очевидна необходимость учета вышеуказанных явлений в электронной микроскопии в атмосферной среде с использованием влажных препаратов.

Еще одной биологической тонкостью для проведения электронной микроскопии в газовых средах является окисляющий характер многих сред, в том числе входящих в стандартные среды газовой закачки. Так, с 1940-х гг. известны эффекты газовой полимеризации при электронной или иной зарядно-корпускулярной бомбардировке поверхностей, влекущие за собой морфологически обнаруживаемые изменения [91], а в 1970-х гг. разработаны технологии абляции биологических поверхностей при посредстве активированного кислорода для сканирующей электронной микроскопии [92]. Кроме того,

несмотря на явный уклон в наноструктурное материаловедение, продолжает сохранять актуальность проблематика синтеза или обработки вещества (клеток, тканей, биоматериалов и пр.) сфокусированным электронным или ионным пучком [93, 94], приводящая к наработке многих экзотических интермедиатов и сборке экзотических структур. Множественные попытки минимизировать и редуцировать взаимодействия пучка с газом в электронных микроскопах регулируемого давления [95] в конечном итоге ведут к уменьшению химических процессов в газовой среде и на поверхности, но не исключают некоторых индуцированных структурных перестроек в самом веществе.

Физическая оптимизация методами Монте-Карло, часто используемая при моделировании рассеяния электронного пучка специалистами в области электронной микроскопии [96], когда на траектории распространения электронов образец предстает как мишень, с которой и происходит взаимодействие пучка, не дает ответа на вопрос о структурно-химических перестройках в среде, если они не сопряжены с элементарным химизмом (изотопией, ядерно-физическими процессами). Как правило, такие симуляции имеют влияние на улучшение качества изображения [97], но не на биологически ориентированную оптимизацию физики процесса взаимодействия пучка с тканью; хотя в биомедицине известно, что рациональная конфигурация электронного пучка обеспечивает оптимизацию структурно-биологического эффекта [98], а в криоэлектронной микроскопии давно используются методы сайт-специфичной фокусировки пучка [99]. Частичным решением в методе газовой электронной микроскопии биологических препаратов может быть т.н. «газовая юбка» – уширение пучка при его рассеянии в газовой среде [100], хотя уменьшение фокусировки влечет за собой понижение качества изображения, а последнее чревато хорошо известным воздействием на результаты полуколичественного рентгеновского микроанализа в колонне [101]. Проблемы же с разделением компонент сигнала в сканирующей электронной микроскопии при условиях среды (газа) или атмосферы и при «естественной» температуре известны с 1970-х гг. [102], а методы их разделения появились только в 1990-х – не ранее чем средства компьютерной автоматизации позволили это сделать [103].

4. ПРИМЕНИМОСТЬ ГАЗОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ АБИОГЕНЕЗА

С точки зрения корпускулярного воздействия на биологические и абиогенные среды [104, 105],

могут быть интересными синхронизированный синтез и химический анализ протобиополимеров под пучком напрямую в газовой колонне, воспроизводящий условия абиогенеза и формирования предбиологических соединений под действием известных корпускулярных факторов в различных газовых атмосферах. Анализ в режиме реального времени в данном случае может проводиться по принципам позиционно-чувствительного электронного микрозондового анализа/спектрометрии вторично-эмиссионного характеристического рентгеновского излучения (энергодисперсионная или волнодисперсионная спектрометрия – в зависимости от того, по энергии или по длине волны делятся фотоны). Также, несмотря на то, что большинство формирующихся протобиополимеров в тонких слоях или пленках представляют собой частично упорядоченные среды («soft matter»), реализуем микро-рентгеноструктурный анализ формируемых образований [106]. С химических позиций, задача моделирования абиогенетических процессов в искусственных газовых атмосферах обусловлена тем, что известные или предполагаемые составы предбиологических и ксенобиотических атмосфер, в частности восстановительная метансодержащая и водородсодержащая [107], вулканические эруптивные и фумарольные газы [108], азотсодержащая атмосфера в ряде экзотических экзопланетарных концепций [109] и целый ряд других, содержат различные комбинации простых соединений органоенов, таких как аммиак, метан, водород, азот, угарный, углекислый и сернистый газы, сероводород, формальдегид и др., необходимых для абиогенного синтеза органики. В общем термодинамическом случае абиогенная атмосфера представляет собой идеализируемый газ, с которым протоклеточная мембрана или липидный бислой может «работать» как демон Максвелла [110]. С позиций физики абиогенеза, данная постановка задач обусловлена известной ролью космических лучей [104, 105], в особенности заряженных частиц [111, 112], в формировании предбиологических органических соединений в газовых средах [113], что кардинально отлично от принципов космического формирования тех же соединений под действием космических излучений [114]. Аналогичное верно для эмиссии частиц радиоизотопами [115], которая, учитывая наличие явлений кластерной радиоактивности, испускания протона или двух протонов, позитронного распада и т.д., позволяет бомбардировать «прекурсор» абиогенного синтеза достаточно дифференцированными для синтеза разных продуктов видами излучений. Также в связи с возможной каталитической ролью минеральной подложки в процес-

сах предбиологического синтеза и структурообразования принципиальное значение при исследовании подобных процессов в электронно-микроскопической камере имеет учет химического взаимодействия среды с подложкой. Этот аспект проблемы, впрочем, не входит в задачи настоящей статьи, поэтому подробно далее не рассматривается. Вследствие восстановительного характера первичной атмосферы (соответствующего необходимым условиям абиогенного синтеза органики) проблем с фиксацией образцов в газовой среде, сопряженных с газовым окислением (см. п. 3), при моделировании абиосинтеза в газовой атмосфере в электронно-микроскопической колонне быть не должно.

НЕОБХОДИМАЯ ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕМАРКА

В заключение следует отметить, что, не являясь средством неразрушающего контроля, метод газовой электронной микроскопии работает как аналитический только до пределов, определяемых квантовой структурой возможных прекурсоров или протобионтов [116, 117], после чего он начинает прямо действовать на образец как таковой, вызывая организацию либо перестройки в его структуре. В связи с этим мы также хотели бы предостеречь читателей от невнимательного цитирования без использования оригинала, часто встречающегося в русскоязычной периодике, когда с газовыми электронными микроскопами, подобными рассматриваемым в настоящей работе, «смешиваются» микроскопы, способные фиксировать поведение квантового газа [118, 119], в силу чего говорится о достижимости на газовых электронных микроскопах квантового разрешения, что не реализуемо на практике в силу взаимодействия со средой в тракте распространения пучка до объекта или же, правильнее говорить, когда речь идет о воздействии пучком на препарат-прекурсор, мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проблема *environmental condition microscopy* может быть разделена на две части – микроскопия при естественной («комнатной»/«лабораторной») температуре и микроскопия в естественной атмосфере. Технически обе задачи могут быть решены в одном объединенном для данных целей устройстве. Последняя задача может быть экстраполирована и на другие атмосферы, не эквивалентные по составу земной атмосфере. В таких условиях можно моделировать абиогенез напрямую под пучком электронного микроскопа либо исследовать ксенобиологиче-

ские системы, хемоавтотрофные бактерии (включая анаэробные), лабильность микробных экосистем для сред с разным составом газа и т.п. Возможность возникновения компартментализованных структур из абиогенного материала уже на ранних стадиях формирования протобиологических систем в соответствующих условиях первичной земной атмосферы делает морфоструктурное исследование продуктов абиогенного синтеза необходимым дополнением к данным об их химическом составе.

2. Проблема глубинной *environmental* электронной микроскопии в жидких средах не решена и, вероятно, неразрешима на данном этапе (хотя, например, на ускорителях – источниках синхротронного излучения возможны соответствующие отведения, но это не электронные отведения, а отведения «оптического» пучка).

3. Возможно совмещение морфологического («*localomics*»), динамического («*dynamomics*»), спектрального (спектроскопия вторично-эмиссионного рентгеновского излучения или микрозонд в режиме сканирования, относящийся по масштабу времен к «*localomics*») и структурного (электронно-дифракционные и рентгенодифракционные методы *in situ*; вообще – структурный анализ *in situ* soft mater структур, таких как биологические системы) анализов при работе и манипуляциях в газовой среде.

4. Совмещение «*localomics*» и «*dinamomics*» ведет к синхронному морфофизиологическому/функционально-морфологическому и морфобиохимическому/гистохимическому анализам *in situ* при заданных условиях среды, что создает предпосылки для принципиально новой 4D-ультраморфологии на газовой-электронно-микроскопической основе.

5. Возможно совмещение синтеза или индуцированной самосборки органических структур и соединений под пучком в атмосфере, что позволяет применять метод газовой электронной микроскопии для моделирования химических стадий абиогенеза и иных инициированных пучком процессов, используя газонаполняемую камеру как экспериментальный реактор.

Мы выражаем благодарность сотрудникам Отдела метрологии и средств измерений ГЕОХИ РАН, обеспечивших нас документацией на уникальное экспериментальное оборудование, давшее возможность начать работы в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller J.H., Sowa Resat M., Metting N.F., Wei K., Lynch D.J., Wilson W.E. Monte Carlo Simulation of Single-cell Irradiation by an Electron Microbeam. *Radiat Environ Biophys.* 2000, **39**(3), 173–177.

2. Miller J.H., Suleiman A., Chrisler W.B., Sowa M.B. Simulation of Electron-beam Irradiation of Skin Tissue Model. *Rad. Res.* 2011, **175**(1), 113–118.
3. Moncrieff D.A., Barker P.R., Robinson V.N.E. Electron Scattering by Gas in the Scanning Electron Microscope. *J Phys D Appl Phys.* 1979, **12**(4), 481–488.
4. Mathieu C. The Beam-gas and Signal-gas Interactions in the Variable Pressure Scanning Electron Microscope. *Scanning Microscopy.* 1999, **13**(1), 23–41.
5. Morgan S.W., Phillips M.R. Transient Analysis of Gaseous Electron-ion Recombination in the Environmental Danilatos G.D. Cathodoluminescence and Gaseous Scintillation in the Environmental SEM. *Scanning.* 1986, **8**, 279–284.
6. Danilatos G.D. Cathodoluminescence and Gaseous Scintillation in the Environmental SEM. *Scanning.* 1986, **8**, 279–284.
7. Liu W., Liu Y., Chen H., Liu K., Tao H., Sun X. Xenon Preconditioning: Molecular Mechanisms and Biological Effects. *Medical Gas Research.* 2013, **3**(1), 3. doi: 10.1186/2045-9912-3-3.
8. Delgado-Roche L., Martínez-Sánchez G., Re L. Ozone Oxidative Preconditioning Prevents Atherosclerosis Development in New Zealand White Rabbits. *J Cardiovasc Pharm.* 2013, **61**(2), 160–165.
9. Smit K.F., Oei G.T., Brevoord D., Stroes E.S., Nieuwland R., Schlack W.S., Hollmann M.W., Weber N.C., Preckel B. Helium Induces Preconditioning in Human Endothelium in Vivo. *Anesthesiology.* 2013, **118**(1), 95–104.
10. Duan Z., Zhang L., Liu J., Xiang X., Lin H. Early Protective Effect of Total Hypoxic Preconditioning on Rats Against Systemic Injury from Hemorrhagic Shock and Resuscitation. *J Surg. Res.* 2012, **178**(2), 842–850.
11. Soejima Y., Ostrowski R.P., Manaenko A., Fujii M., Tang J., Zhang J.H. Hyperbaric Oxygen Preconditioning Attenuates Hyperglycemia Enhanced Hemorrhagic Transformation After Transient MCAO in Rats. *Medical Gas Research.* 2012, **2**(1), 9. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.03.019.
12. Semenza G.L., Prabhakar N.R. Gas Biology: Small Molecular Medicine. *J Mol Med-Imm.* 2012, **90**(3), 213–215.
13. Nakao A., Toyoda Y. Book Review: Gas Biology Research in Clinical Practice, edited by Toshikazu Yoshikawa and Yuji Naito. *Medical Gas Research.* 2011, **1**, 1–3.
14. Frey S.A. Stroboscopic Technique for Electron Micrographs. *Med. Biol.* 1965, **15**(Supplement), 19–21.
15. Plows G.S., Nixon W.C. Stroboscopic Scanning Electron Microscopy. *J Sci Instrum.* 1968, **2**(1), 595–600.
16. Robinson G.Y. Stroboscopic Scanning Electron Microscopy at Gigahertz Frequencies. *Rev Sci Instrum.* 1971, **42**(2), 251–255.
17. Szentesi O.I. Stroboscopic Electron Mirror Microscopy at Frequencies up to 100 MHz. *J Phys E Instrum.* 1972, **5**(6), 563–567.
18. Zewail A.H. Four-dimensional Electron Microscopy. *Science.* 2010, **328**, 187–193.
19. Kwon O.H., Ortalan V., Zewail A.H. Macromolecular Structural Dynamics Visualized by Pulsed Dose Control in 4D Electron Microscopy. *PNAS USA*, 2011, **108**(15), 6026–6031.
20. Baskin J.S., Park H.S., Zewail A.H. Nanomusical Systems Visualized and Controlled in 4D Electron Microscopy. *Nano Lett.* 2011, **11**(15), 2183–2191.
21. Gradov O.V., Gradova M.A. Cryo-electron Microscopy as a Functional Instrument for Systems Biology, Structural Analysis and Experimental Manipulations with Living Cells. A Comprehensive Analytical Review of the Current Works. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2014, **24**(3), 193–211.
22. Nejadasl K.F., Karuppasamy M., Koster A.J., Ravelli R.B. Defocus Estimation from Stroboscopic Cryo-electron Microscopy Data. *Ultramicroscopy.* 2011, **111**(11), 1592–1598.
23. Danilatos G.D. Design and Construction of an Atmospheric or Environmental SEM (part 1). *Scanning.* 1981, **4**, 9–20.
24. Danilatos G.D. Design and Construction of an Atmospheric or Environmental SEM (part 2). *Micron.* 1983, **14**(1), 41–52.
25. Danilatos G.D. Design and Construction of an Atmospheric or Environmental SEM (part 3). *Scanning.* 1985, **7**, 26–42.
26. Danilatos G.D. Design and Construction of an Atmospheric or Environmental SEM (part 4). *Scanning.* 1990, **12**, 23–27.
27. De Jonge N., Bigelow W.C., Veith G.M. Atmospheric Pressure Scanning Transmission Electron Microscopy. *Nano Lett.* 2010, **10**(3), 1028–1031.
28. Morrison I.E., Dennison C.L., Nishiyama H., Suga M., Sato C., Yarwood A., O'Toole P.J. Atmospheric Scanning Electron Microscope for Correlative Microscopy. *Method Cell Biol.* 2012, **111**, 307–324.
29. Maruyama Y., Ebihara T., Nishiyama H., Suga M., Sato C. Immuno EM-OM Correlative Microscopy in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). *J Struct Biol.* 2012, **180**(2), 259–270.
30. Suga M., Nishiyama H., Konyuba Y., Iwamatsu S., Watanabe Y., Yoshiura C., Ueda T., Sato C. The Atmospheric Scanning Electron Microscope with Open Sample Space Observes Dynamic Phenomena in Liquid or Gas. *Ultramicroscopy.* 2011, **111**(12), 1650–1658.
31. Sato C., Manaka S., Nakane D., Nishiyama H., Suga M., Nishizaka T., Miyata M., Maruyama Y. Rapid Imaging of Mycoplasma in Solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, **417**(4), 1213–1218.
32. Murai T., Sato M., Nishiyama H., Suga M., Sato C. Ultrastructural Analysis of Nanogold-labeled Cell Surface Microvilli in Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy and their Relevance in Cell Adhesion. *Int J Mol Sci.* 2013, **14**(10), 20809–20819.

33. Nishiyama H., Suga M., Ogura T., Maruyama Y., Koizumi M., Mio K., Kitamura S., Sato C. Atmospheric Scanning Electron Microscope Observes Cells and Tissues in Open Medium Through Silicon Nitride Film. *J Struct Biol.* 2010, **169**(3), 438–449.
34. Nishiyama H., Suga M., Ogura T., Maruyama Y., Koizumi M., Mio K., Kitamura S., Sato C. Atmospheric Scanning Electron Microscope Observes Cells and Tissues in Open Medium Through Silicon Nitride Film. *J Struct Biol.* 2010, **172**(2), 191–202.
35. Luo P., Morrison I., Dudkiewicz A., Tiede K., Boyes E., O'Toole P., Park S., Boxall A.B. Visualization and Characterization of Engineered Nanoparticles in Complex Environmental and Food Matrices using Atmospheric Scanning Electron Microscopy. *J Microsc.* 2013, **250**(1), 32–41.
36. Maruyama Y., Ebihara T., Nishiyama H., Konyuba Y., Senda M., Numaga-Tomita T., Senda T., Suga M., Sato C. Direct Observation of Protein Microcrystals in Crystallization Buffer by Atmospheric Scanning Electron Microscopy. *Int J Mol Sci.* 2012, **13**(8), 10553–10567.
37. Creemer J.F., Helveg S., Hoveling G.H., Ullmann S., Molenbroek A.M., Sarro P.M., Zandbergen H.W. Atomic-scale Electron Microscopy at Ambient Pressure. *Ultramicroscopy*, 2008, **108**(9), 993–998.
38. Heide H.G. Electron Microscopic Observation of Specimens under Controlled Gas Pressure. *J Cell Biol.* 1962, **13**(1), 147–152.
39. Clode P.L. Charge Contrast Imaging of Biomaterials in a Variable Pressure Scanning Electron Microscope. *Journ. Struc. Biol.*, 2006, **155**(3), 505–511.
40. Griffin B.J. Variable Pressure and Environmental Scanning Electron Microscopy: Imaging of Biological Samples. *Meth Mol Biol.* 2007, **369**, 467–495.
41. Niitsuma J., Sekiguchi T., Yuan X.L., Awano Y. Electron Beam Nanoprocessing of a Carbon Nanotube Film Using a Variable Pressure Scanning Electron Microscope. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007, **7**(7), 2356–2360.
42. Kliewer C.E., Kiss G., Demartin G.J. Ex situ Transmission Electron Microscopy: a Fixed-bed Reactor Approach. *Microsc Microanal.* 2006, **12**(2), 135–144.
43. Houwink A.L. Flagella. Gas Vacuoles and Cell-wall Structure in Halobacterium Halobium; an Electron Microscope Study. *J Gen Microbiol.* 1956, **15**(1), 146–150.
44. Maina J.N. Scanning Electron Microscope Study of the Spatial Organization of the Air and Blood Conducting Components of the Avian Lung (Gallus Gallus Variant Domesticus). *Anat Rec.* 1988, **222**(2), 145–153.
45. McMaster T.J., Miles M.J., Walsby A.E. Direct Observation of Protein Secondary Structure in Gas Vesicles by Atomic Force Microscopy. *Biophys J.* 1996, **70**(5), 2432–2436.
46. Fowler S.A., Korb D.R., Finnemore V.M., Ross R.N., Allansmith M.R. Coatings on the Surface of Siloxane Gas Permeable Lenses Worn by Keratoconic Patients: a Scanning Electron Microscope Study. *CLAO J.* 1987, **13**(4), 207–210.
47. Sugi H., Akimoto T., Chaen S., Suzuki S. ATP-induced Axial Movement of Myosin Heads in Living Thick Filaments Recorded with a Gas Environmental Chamber Attached to the Electron Microscope. *Adv Exp Med Biol.* 1998, **453**, 53–61.
48. Minoda H., Okabe T., Inayoshi Y., Miyakawa T., Miyauchi Y., Tanokura M., Katayama E., Wakabayashi T., Akimoto T., Sugi H. Electron Microscopic Evidence for the Myosin Head Lever Arm Mechanism in Hydrated Myosin Filaments Using the Gas Environmental Chamber. *Biochem Biophys Res Co.* 2011, **405**(4), 651–656.
49. Engelhardt W.A., Ljubimowa M.N. Myosine and Adenosinetriphosphatase. *Nature.* 1939, **144**(3650), 668–669.
50. Gai P.L. Environmental High Resolution Electron Microscopy of Gas – Catalyst Reactions. *Top Catal.* 1999, **8**(1–2), 97–113.
51. Swiegers G. *Mechanical Catalysis: Methods of Enzymatic, Homogeneous, and Heterogeneous Catalysis.* Hoboken, New Jersey: Wiley, 2008. 352 p.
52. Steinfeld J.I., Francisco J.S., Hase W.L. *Chemical Kinetics and Dynamics.* Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1998. 560 p.
53. White A. Dynamic Aspects of Biochemistry. *Yale J Biol Med.* 1947, **19**(5), 900.
54. Cammarata P.S. Dynamic Aspects of Biochemistry. *Yale J Biol Med.* 1953, **25**(6), 546–547.
55. Turning Over an Old Leaf: Dynamic Aspects of Biochemistry by Ernest Baldwin. pp. 457. Cambridge University Press, 1947. *Biochem Educ.* 1988, **16**(3), 180.
56. Benesch J.L., Ruotolo B.T. Mass Spectrometry: Come of Age for Structural and Dynamical Biology. *Curr Opin Struc Biol.* 2011, **21**(5), 641–649.
57. Gradova N.B. A Review of the Textbook «Osnovy dinamicheskoi biokhimii» (Fundamentals of Dynamic Biochemistry) by V. K. Plakunov and Yu. A. Nikolaev (Moscow: Logos, 2010). *Microbiology*, 2011, **80**(2), 273.
58. Kamino T., Yaguchi T., Konno M., Watabe A., Marukawa T., Mima T., Kuroda K., Saka H., Arai S., Makino H., Suzuki Y., Kishita K. Development of a Gas Injection/Specimen Heating Holder for Use with Transmission Electron Microscope. *J Electron Microsc.* 2005, **54**(6), 497–503.
59. Sharma R. Design and Applications of Environmental Cell Transmission Electron Microscope for *in situ* Observations of Gas-Solid Reactions. *Microsc Microanal.* 2001, **7**(6), 494–506.
60. Kawasaki T., Ueda K., Ichihashi M., Tanji T. Improvement of Windowed Type Environmental-cell Transmission Electron Microscope for *in situ* Observation of Gas-solid Interactions. *Rev Sci Instrum.* 2009, **80**(11), 113701-1–113701-5.
61. Robertson I.M., Tetter D. Controlled Environment Transmission Electron Microscopy. *Microsc Res Techniq.* 1998, **42**(4), 260–269.

62. Danilatos G.D., Postle R. The Environmental Scanning Electron Microscope and its Applications. *Scan Electron Microsc.* 1982, **1**, 1–16.
63. Coillot D., Podor R., Méar F.O., Montagne L. Characterization of Self-healing Glassy Composites by High-temperature Environmental Scanning Electron Microscopy (HT-ESEM). *J Electron Microsc.* 2010, **59**(5), 359–366.
64. Sigeo D.C., Gilpin C. X-ray Microanalysis with the Environmental Scanning Electron Microscope: Interpretation of Data Obtained under Different Atmospheric Conditions. *Scanning Microscopy. Suppl.* 1994, **8**, 219–27.
65. Hansen T.W., Wagner J.B. Environmental Transmission Electron Microscopy in an Aberration-corrected Environment. *Microsc Microanal.* 2012, **18**(4), 684–690.
66. Gauvin R., Griffin B., Nockolds C., Phillips M., Joy D.C. A Method to Measure the Effective Gas Path Length in the Environmental or Variable Pressure Scanning Electron Microscope. *Scanning.* 2002, **24**(4), 171–174.
67. Toth M., Thiel B.L., Knowles W.R. Gas Cascade Amplification in Ultra-high-resolution Environmental Scanning Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* 2010, **16**(6), 805–809.
68. Crozier P.A., Chenna S. In Situ Analysis of Gas Composition by Electron Energy-loss Spectroscopy for Environmental Transmission Electron Microscopy. *Ultramicroscopy*, 2011, **111**(3), 177–185.
69. Zou Q., Hatta A. Electron Field Emission from Carbon Nanotubes in Air for Excitation of Atmospheric Pressure Microplasma. *J Nanosci Nanotechno.* 2009, **9**(2), 924–928.
70. Kim E.L., Chuprunova S.E., Portnov V.N. A Method for Quality Control of Water-Soluble Single Crystals by X-Ray Diffractometry under Heating. *Industrial Laboratory.* 2000, **66**(9), 590–593.
71. Gukhman A.A., Volynets A.Z., Gavrilova E.V., Efremenko G.N. Theory of Psychrometry. *J. Eng. Phys.*, 1975, **28**(4), 499–504.
72. Nonami H., Boyer J.S. Origin of Growth-induced Water Potential: Solute Concentration is Low in Apoplast of Enlarging Tissues. *Plant Physiol.* 1987, **83**(3), 596–601.
73. Shackel K.A. Direct Measurement of Turgor and Osmotic Potential in Individual Epidermal Cells: Independent Confirmation of Leaf Water Potential as Determined by *in situ* Psychrometry. *Plant Physiol.* 1987, **83**(4), 719–722.
74. Ham R.G., Puck T.T. A Regulated Incubator Controlling CO₂ Concentration, Humidity and Temperature for Use in Animal Cell Culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962, **111**, 67–71.
75. Liebes L.F., Maher V.M., Scherr P., McCormick J.J. Automatic Gas Tank Switching System for CO₂ Incubators. *In Vitro*, 1976, **12**(3), 265–268.
76. Ozawa M., Nagai T., Kaneko H., Noguchi J., Ohnuma K., Kikuchi K. Successful Pig Embryonic Development in Vitro Outside a CO₂ Gas-regulated Incubator: Effects of pH and Osmolality. *Theriogenology.* 2006, **65**(4), 860–869.
77. Swif J.A., Brown A.C. An Environmental Cell for the Examination of Wet Biological Specimens at Atmospheric Pressure by Transmission Scanning Electron Microscopy. *J Phys E Sci Instrum.* 1970, **3**(11), 924–926.
78. Parsons D.F. Structure of Wet Specimens in Electron Microscopy. Improved Environmental Chambers Make it Possible to Examine Wet Specimens Easily. *Science.* 1974, **186**(4162), 407–414.
79. Donald A.M. The Use of Environmental Scanning Electron Microscopy for Imaging Wet and Insulating Materials. *Nat. Mater.* 2003, **2**(8), 511–516.
80. Henderson R., McMullan G. Problems in Obtaining Perfect Images by Single-particle Electron Cryomicroscopy of Biological Structures in Amorphous Ice. *Microscopy.* 2013, **62**(1), 43–50.
81. Nolin F., Michel J., Wortham L., Tchelidze P., Balossier G., Banchet V., Bobichon H., Lalun N., Terryn C., Ploton D. Changes to Cellular Water and Element Content Induced by Nucleolar Stress: Investigation by a Cryo-correlative Nano-imaging Approach. *Cell Mol Life Sci.* 2013, **70**(13), 2383–2394.
82. Krichevskii E.S., Volchenko A.G., Podgornyi Y.V., Proskuryakov R.M., Roskin V.I. Thermovacuum Aquametry – New Method of Measuring Moistness. *Meas Tech.* 1976, **19**(7), 1042–1045.
83. Jung Y.C., Bhushan B. Wetting Behaviour during Evaporation and Condensation of Water Microdroplets on Superhydrophobic Patterned Surfaces. *J Microsc-Oxford.* 2008, **229**(1), 127–140.
84. De Mets M., Lagasse A. Scanning Electron Microscopic Investigation of Gas Chromatographic Support Material. *Chromatographia.* 1969, **2**(9), 401–403.
85. Sakodinsky K., Panina L. Scanning Electron Microscopic Investigations of Gas Chromatographic Porous Polymer Sorbents. *Chromatographia.* 1971, **4**(3), 113–118.
86. Yang R.T., Wong C. Scanning Electron Microscopy Study of the Kinetics of a Gas-solid Reaction. *Ind Eng Chem. Fundam.* 1983, **22**(4), 380–384.
87. Kim B., Lee J.G., Kim E., Yun S., Kim K., Kim J.Y. MFM and Gas Adsorption Isotherm Analysis of Proton Beam Irradiated Multi-walled Carbon Nanotubes. *Ultramicroscopy.* 2008, **108**(10), 1228–1232.
88. Sharma R., Weiss K. Development of a TEM to Study *in situ* Structural and Chemical Changes at an Atomic Level during Gas-solid Interactions at Elevated Temperatures. *Microsc Res Tech.* 1998, **42**(4), 270–280.
89. Nagoya University: Improvement of Windowed Type Environmental-cell Transmission Electron Microscope for *in situ* Observation of Gas-solid Interactions. *Issues in Applied, Analytical, and Imaging Sciences Research* (Atlanta, Georgia: Scholarly Edition), 2011 Edition, 2011. 1749 p.
90. Sayagués M.J., Krumeich F., Hutchison J.L. Solid-gas Reactions of Complex Oxides Inside an Environmen-

- tal High-resolution Transmission Electron Microscope. *Micron*. 2001, **32**(5), 457–471.
91. Watson J.H. Electron Microscope Observations of the Morphology of Several Gases Polymerized by Charged-particle Bombardment. *J Phys Colloid Chem*. 1947, **51**(3), 654–661.
 92. Barthlott W., Ehler N., Schill R. Abtragung biologischer Oberflächen durch hochfrequenzaktivierten Sauerstoff für die Raster Elektronenmikroskopie. *Mikroskopie*. 1976, **32**(1–2), 35–44.
 93. Ganczarczyk A., Geller M., Lorke A. XeF₂ Gas-assisted Focused-electron-beam-induced Etching of GaAs with 30 nm Resolution. *Nanotechnology*. 2011, **22**(4), 1–5.
 94. Wu H.M., Stern L.A., Chen J.H., Huth M., Schwalb C.H., Winhold M., Porra F., Gonzalez C.M., Timilsina R., Rack P.D. Synthesis of Nanowires via Helium and Neon Focused Ion Beam Induced Deposition with the Gas Field Ion Microscope. *Nanotechnology*. 2013, **24**(17), 1–8.
 95. Adamiak B., Mathieu C. The Reduction of the Beam Gas Interactions in the Variable Pressure Scanning Electron Microscope with the Use of Helium Gas. *Scanning*. 2000, **22**(3), 178–181.
 96. Mansour O., Kadoun A., Khouchaf L., Mathieu C. Monte Carlo Simulation of the Electron Beam Scattering under Water Vapor Environment at Low Energy. *Vacuum*. 2013, **87**, 11–15.
 97. Chee A.K.W., Broom R.F., Humphreys C.J., Bosch E.G.T. A Quantitative Model for Doping Contrast in the Scanning Electron Microscope using Calculated Potential Distributions and Monte Carlo Simulations. *J Appl Phys*. 2011, **109**(1), 013109-1–013109-9.
 98. Hoburg A., Keshlaf S., Schmidt T., Smith M., Gohs U., Perka C., Pruss A., Scheffler S. Fractionation of High-dose Electron Beam Irradiation of BPTB Grafts Provides Significantly Improved Viscoelastic and Structural Properties Compared to Standard Gamma Irradiation. *Knee Surg Sport Tr A*. 2011, **19**(11), 1955–1961.
 99. Rubino S., Akhtar S., Melin P., Searle A., Spellward P., Leifer K. A Site-specific Focused-ion-beam Lift-out Method for Cryo Transmission Electron Microscopy. *J Struct Biol*. 2012, **180**(3), 572–576.
 100. Khouchaf L. The Surface Skirt in Gaseous Scanning Electron Microscope (GSEM). *Microbiol Res*. 2013, **1**(3), 29–32.
 101. Khouchaf L., Verstraete J. Electron Scattering by Gas in the Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM): Effects on the Image Quality and on the X-ray Microanalysis. *J Phys-Paris*. 2004, **118**, 237–243.
 102. Shah J.S., Beckett A. A Preliminary Evaluation of Moist Environment Ambient Temperature Scanning Electron Microscopy. *Micron*. 1979, **10**(1), 13–23.
 103. Fletcher A.L., Thiel B.L., Donald A.M. Signal Components in the Environmental Scanning Electron Microscope. *J Microsc*. 1999, **196**(1), 26–34.
 104. Erlykin A. Cosmic Rays, Climate and the Origin of Life. *CERN Courier*, 24.02.2010, URL: <http://cerncourier.com/cws/article/cern/41723>
 105. Erlykin A.D., Wolfendale A.W. Long Term Time Variability of Cosmic Rays and Possible Relevance to the Development of Life on Earth. *Surv Geophys*. 2010, **31**(4), 383–398.
 106. Stribeck N. *X-Ray Scattering of Soft Matter*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2007, 238 p.
 107. Mulikidjanian A.Y., Galperin M.Y. On the Origin of Life in the Zinc World. 2. Validation of the Hypothesis on the Photosynthesizing Zinc Sulfide Edifices as Cradles of Life on Earth. *Biol Direct*. 2009, **4**, 1–37.
 108. Podkletnov N.E., Markhinin E.K. New Data on Abiogenic Synthesis of Prebiological Compounds in Volcanic Processes. *Origins Life*, 1981, **11**(4), 303–315.
 109. Balucani N. Nitrogen Fixation by Photochemistry in the Atmosphere of Titan and Implications for Prebiotic Chemistry. *Astrophysics Space*. 2013, **35**, 155–164.
 110. Abel D.L. Moving “Far from Equilibrium” in a Prebiotic Environment: The Role of Maxwell’s Demon in Life Origin. *Cell Origin Life Ext*. 2012, **22**, 219–236.
 111. Kobayashi K., Tsuchiya M., Oshima T., Yanagawa H. Abiotic Synthesis of Amino Acids and Imidazole by Proton Irradiation of Simulated Primitive Earth Atmosphere. *Origins Life Evol B*. 1990, **20**, 99–109.
 112. Kobayashi K., Kaneko T., Tsuchiya M., Saito T., Yamato K., Koike J., Oshima T. Formation of Bioorganic Compounds in Planetary Atmosphere by Cosmic Radiation. *Adv Space Res*. 1995, **15**(3), 127–130.
 113. Kobayashi K., Kaneko T., Saito T., Oshima T. Amino Acid Formation in Gas Mixtures by High Energy Particle Irradiation. *Origins Life Evol B*. 1998, **28**(2), 155–165.
 114. Simakov M.B., Kuzicheva E.A., Gontareva N.B. Abiogenic Synthesis of Oligopeptides in the Open Space. *Paleontolog J*. 2013, **47**(9), 1097–1103.
 115. Martell E.A. Radionuclide-induced Evolution of DNA and the Origin of Life. *J Mol Evol*. 1992, **35**(4), 346–355.
 116. Tamulis A., Grigalavicius M. Quantum Entanglement in photoactive prebiotic systems. *Syst Synth Biol*. 2014, **8**(2), 117–140.
 117. Tamulis A., Grigalavicius M., Baltrusaitis J. Phenomenon of Quantum Entanglement in a System Composed of Two Minimal Protocells. *Origins Life Evol B*. 2013, **43**(1), 49–66.
 118. Bakr W.S., Gillen J.I., Peng A., Fölling S., Greiner M. A Quantum Gas Microscope for Detecting Single Atoms in a Hubbard-regime Optical Lattice. *Nature*. 2009, **462**(7269), 74–77.
 119. Gericke T., Würtz P., Reitz D., Langen T., Ott H. High-resolution Scanning Electron Microscopy of an Ultracold Quantum Gas. *Nature Physics*. 2008, **4**, 949–953.

Поступила 13.10.14
После доработки 02.03.15

Summary

This paper reviews opportunities of using electron microscopy in various gas atmospheres for the analysis and morpho-physiological modification of biological structures. The approaches that allow varying the gaseous phase content, as well as temperature, humidity and pressure are considered. The applicability of both kinetic and dynamic approaches to the tissue and bioinorganic structure manipulations is pointed out. A possibility of simula-

tion of the beam-induced formation and disintegration of abiogenetic molecular structures is also mentioned as a particular case of the electron beam influence and treatment of the precursor medium in an artificial atmosphere.

Keywords: electron microscopy, atmospheric scanning, electron beam processing, artificial atmospheres, gas micro-chambers, abiogenesis.